

## A GOMBAHIFÁK MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA A GAZDANÖVÉNY SZÖVETEIBEN

VAGAS ENDRE

(Közlésre érkezett: 1973. december 10.)

A gombakártevők sejtfonalainak (*mycéliumának*) mikroszkópos kimutatása gazdasági növényeink szöveteiben, de akár épület- és ipari fa-anyagainkban is, egyaránt fontos feladat. Az utóbbi időben a felsoroltak mellett még a fatönkök felületén végzett gombatermesztés melléktermékeként jelentkező ún. „mikófa” vizsgálatában is szerepet kapott. Nem jelentéktelen azonban e kérdés szemléltetéstechnikai vonatkozása sem; azaz, hogy miként követhetjük nyomon és demonstrálhatjuk a gombafonalak behatolás-, terjedés- és kártevésmódját a gazdanövényben. A gombakártevők finom sejtfonalaikkal ugyanis átszövik a gazdanövényt, miközben a sejtek anyagának jelentős részét felélik, felhasználják; az ipari fa-anyag állományát pedig nagymértékben átalakítják, fellazítják, sőt, roncsolják.

A gombahifák kimutatása a gazdanövény szövetei között sokáig meglehetősen problematikus mikrotechnikai feladatnak látszott. Napjainkig erre a célra mindössze négy lényegesebb eljárást — *Pianese* 1896 —, *Cartwright* 1926 —, *Margolena* 1932 — és *Markus* 1951-ből származó módszereit — tart számon az irodalom. Az eddigi módszerek mindegyike lényegében ún. *progresszív* festőeljárás, azaz azon az elven alapszik, hogy a gombafonalak bizonyos festékanyagokat nagyobb mértékben vesznek fel — a metszetben erősebben színeződnek — mint a gazdanövény szövetei. Sajnos, az említett festődési eltérés — amelynek oka a gombafonalak és a növényi sejtfalak, sejtalkotórészek eltérő felépítésében keresendő — a környező szövet és a gombafonalak között nem mindig eléggé szembetűnő. Így a *mycelium* a környezetéből gyakran alig tűnik elő; másrészt az eddigi módszerekkel készült preparátumok többnyire kevésbé időállóak, és ezért alig van mód a gyakorlati és tudományos szempontból igen fontos összehasonlító preparátum-gyűjtemények megőrzésére.

A progresszív módszerek hatásfokánál lényegesen kedvezőbb eredményhez jutunk, ha *regresszív* festőeljáráshoz folyamodunk; azaz a gazdanövény szöveteiben lazán — egyben feleslegesen — kötődött festékanyagok jelentékeny részét úgy vonjuk ki (*differenciáljuk*), hogy a festés eredményét a gombafonalakra koncentráljuk. Az egyébként mérsékelt eredményeket nyújtó Cartwright-féle eljárást differenciálás közbeiktatásával a következőként alakíthatjuk élesen színező módszerre:

A feldolgozásra szánt friss növényi anyagot 70%-os alkoholban, 5—10%-os formalinoldatban, esetleg *Bouin*-oldatban rögzítjük; majd paraffinba ágyazzuk. Az ipari faanyagot általában nem rögzítjük. A keményebb fafajtákat vízben főzve puhítjuk, majd közvetlenül — beágyazás nélkül — metsszük mikrotom segítségével. A közvetlen metszésre nem alkalmas — könnyen töredező — faanyagot szintén paraffinba ágyazottan metsszük. Általában kb. 10—15 mikron vastagságú metszeteket készítünk, mert a vékonyabb metszetekben amycéliumból csak fragmentumok válnának majd megfigyelhetőkké a látótérben. Többnyire *radiális* és *tangenciális* metszeteket készítünk, noha a keresztmetszeti képet sem nélkülözhetjük a gombafertőzőség vizsgálatában.

A festéshez szükséges festékkoldatok:

A) 1%-os vizes safraninoldat

(*Safranin O*, Color Index szám: 50 240)

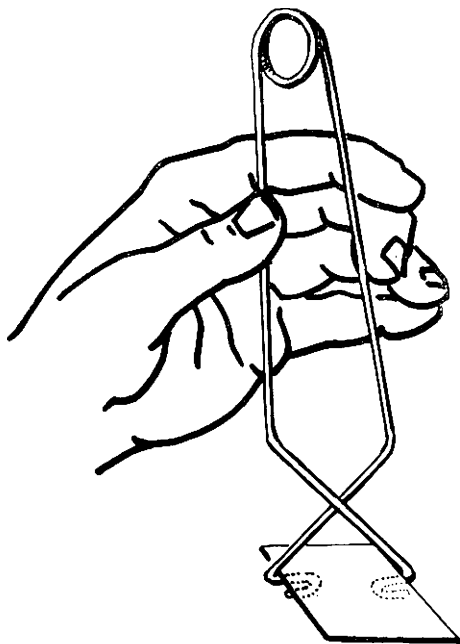
B) *Vízben oldható anilinkék* (Color Index szám: 42 755) 2,5 g

Desztillált víz 25 ml

Telített vizes pikrinsavoldat 100 ml

1. A paraffin kivonása után, amelyet benzollal végzünk, a tárgylemezre ragasztott metszeteket acetონba, 70%-os alkoholba, majd desztillált vízbe helyezzük 4—5 percre.

2. Az „A”-oldatban 1—3 percig festünk, majd desztillált vízzel leöblítjük a metszetet.



1. ábra

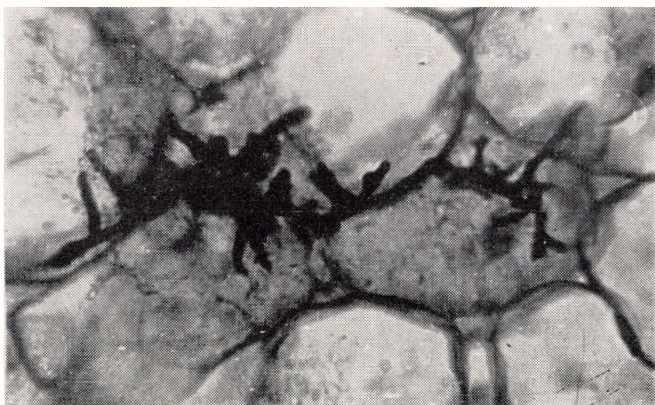
A tárgylemez kezelése *Kirkbrid*-féle csiptetővel.

3. A vízszintesen tartott tárgylemezen a metszetre néhány csepp „B” oldatot rétegezzük — a metszetet az oldattal bőven fedjük —, majd gyenge lángon óvatosan forrásig hevítjük. A tárgylemezt a festékoldat felforralása közben célszerű, ha az ún. *Kirkbrid*-féle drótcsiptetővel tartjuk a láng fölé (1. ábra). A csiptető rugósan rögzíti a tárgylemezt, és a csiptető szárainak összenyomásakor bocsátja el azt.

A tárgylemez lehűlése után a metszetet vízben öblítjük.

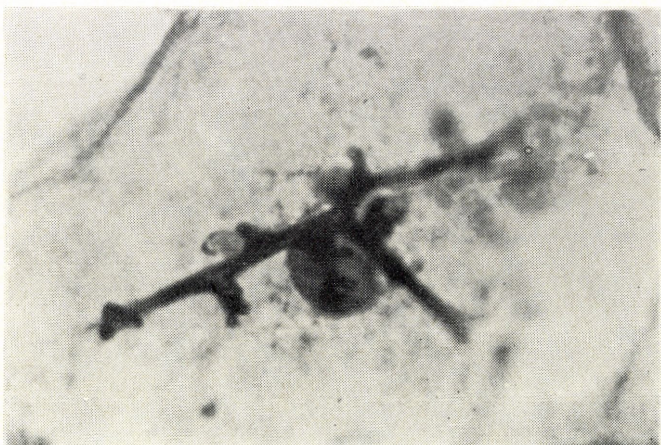
4. A festékfelesleget 10%-os nátronlúgoldatban kivonjuk; a metszetet 2—3 másodpercig tartjuk az oldatban. A metszet téglavörös színt ölt.

5. A metszetet vízzel leöblítjük, majd háromszor cserélt acetonnal kezeljük. Az utolsó acetonkezelés addig tartson, amíg a metszet festékfelesleget már nem ad le.



2. ábra

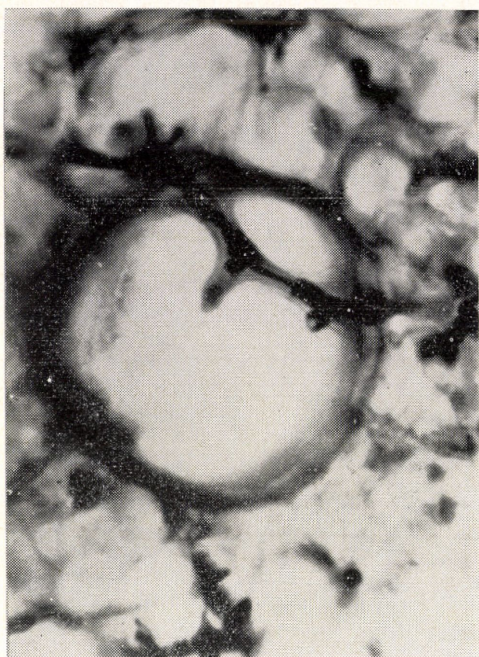
A kukoricaüszög (*Ustilago maydis*) hifái, a szár alapszövetének sejtjeiben. (Mikrofelvétel)



3. ábra

*Ustilago maydis*; hifavég egy alapszöveti sejtben. (Mikrofelvétel)





4. ábra  
Ustilago maydis; hifa a szár szállítószövetében. (Mikrofelvétel)

6. Víztelenítés és átderítés karbol-benzol oldatban (3 rész benzolban 1 rész kristályos karbolsavat oldunk fel). Ebben az oldatban befejeződik a metszetek differenciálása, egyben az eredeti kékes színük is visszatér.

7. A karbolsavat 4—5-ször cserélt benzollal alaposan kimossuk, majd kanadabalzsam segítségével állandósítjuk a készítményt.

A festés eredményeként — az általában halványan festődő alapszöveti háttérből — a gombafonalak éles kékesvörös festődéssel tűnnek elő (2—4. felvételek). A nem fásodott részek kék, a fásodott sejtfalak vörös árnyalatokban színeződnek. A gombafonalak festhetősége az egyes gombacsoportok, sőt fajok esetében némileg eltérő. A preparátumok festése 10—15 éven túl sem változik számottevően.

Számos gombafaj fonalait, egyben a sejtfalak cellulóz és lignin-anyagának a gomba kártétel alatti átalakulását szemléletesen feltünteti az *alciankék* — *auramin* — *safranin* hisztokémiai jellegű festőeljárás is, melyet a Mikroszkopie c. folyóiratban közöltünk az 1961. év folyamán.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat a gombahifák kimutatására ez ideig felhasznált — korlátozott teljesítőképességű — mikrotechnikai módszereket értékeli, majd a *Cartwright*-féle eljárás módosításának lehetőségét ismerteti. Cart-

wright progresszív festőmódszerébe beillesztett — 10%-os nátronlúggal végzett — differenciálás eredményeképpen a szerző a gombafonalak éles festődését éri el az alapszövet mérsékelt színeződése mellett.

A dolgozat utal a gombahifák hisztokémiai jellegű kimutatásának lehetőségére is.

#### I R O D A L O M

1. Cartwright, K. St. G.: A satisfactory method of staining fungal mycelium in wood sections. *Annals of Botany*. 1926. 43, 412.
2. Harms, H.: *Handbuch der Färbstoffe für die Mikroskopie*. Kamp-Lintfort, 1965.
3. Maácz, G. J.: Vágás, E.: A new method for staining of lignified cell-walls. *Mikroskopie*. 1961. 16, 40—43.
4. Maácz, G. J.; Vágás, E.: Investigation of structure- density of the lignified plant cell wall with triple staining. *Mikroskopie*. 1964. 19, 102—6.
5. Marcus, O.: Zum Nachweis von Pilzhyphen in pflanzlichen Geweben. *Mikrokosmos*. 1951. 40, 268.
6. Pianese, G.: Beitrag zur Histologie und Ätiologie des Carcinoms. *Beitr. z. Path. Suppl. I*. 1896. 58. 193.
7. Vágás, E.; Maácz, G. J.: A quick method for staining the hyphae of *Ustilago maydis*. *Stain Technology*. 1960. 15, 129.
8. Willer, K. H.: Anfarbung von parasitischen Pilzen im Gewebe höherer Pflanzen. *Z. für wiss. Mikr.* 1970. 70, 49—57.

A mikrofelveletek a szerző preparátumairól készültek.